AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 66, №1, səh. 53-62 (2011)

Использование Молекулярных Маркеров для Оценки Засухоустойчивости Генотипов Пшеницы (*Triticum* L.)

И.М. Гусейнова
Институт ботаники НАН Азербайджана, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ1073, Азербайджан,
E-mail: huseynova-i@botany-az.org

Засухоустойчивость 12 генотипов пшеницы (*Triticum* L.) была проверена с помощью молекулярных маркеров. В результате ПЦР, проведенного с применением RAPD маркера P6, выявлено, что в отличие от чувствительных генотипов (Гарагылчыг-2, Гийматли-2/17 и среднеустойчивого Гырмызы гюль), у устойчивых генотипов выявляется локус, связанный с этим маркером, в области 920 bp. Показано, что RAPD маркер P7, продуцирующий 750 bp фрагменты, не является абсолютно универсальным для исследованных генотипов пшеницы. С применением функциональных маркеров, специально синтезированных для генов транскрипционного фактора *Dreb 1*, cis-регулирующего устойчивость к засухе, был проведен более глубокий скрининг засухоустойчивости у генотипов пшеницы. При применении маркера P21F/P21R, у всех генотипов пшеницы, за исключением Тале-38 были амплифицированы фрагменты в области 1113 bp, указывая, что на третьей хромосоме генома A у этих генотипов находится ген *Dreb A1*. В отличие от других генотипов, 717 bp ПЦР продукт *Dreb B1* гена, локализованного в геноме B, выявляется только у устойчивого генотипа Баракатли-95. Праймеры P22F/PR и P20/F/P20R, амплифицирующие, соответственно, 596 и 1193 bp фрагменты из генома D, характерного для генотипов *Triticum aestivum* L., не дали положительный результат.

Ключевые слова: *генотипы пшеницы, RAPD праймеры, функциональные маркеры, Dreb гены, ПЦР анализ*

ВВЕДЕНИЕ

Засуха – как проблема, распространенная по всему миру, серьезно влияет на качество и производительность урожая. С увеличением глобального изменения климата, эта ситуация становится все более серьезной (Harb, 2010). На сегодняшний день продолжительное развитие сельского хозяйства и производство продуктов питания требуют устойчивых к стрессу растений, которые способны преодолевать условия водного дефицита и расти в них. Ключевым моментом, приводящим к созданию таких культур, является молекулярное понимание отдельных процессов стресса, которые переплетаются на нескольких уровнях. Физиологические и биохимические изменения в растениях в стрессовых условиях связаны с изменением экспрессии генов (Saibo, 2009). С помощью различных генетических и биохимических подходов были сделаны попытки изучить ключевые гены, ответственные за засухоустойчивость (Wei, 2009; Wang, 2011; Zheng, 2010). Такие исследования, дополняемые новой сравнительной и функциональной геномикой, представляют собой детальные данные об экспрессии засухоиндуцируемых генов, приводящей к накоплению специфических белков, обеспечивающих засухоустойчивость.

В настоящее время RAPD технология широко используется в изучении растительных геномов, в конструировании генетических карт, анализе генетической структуры популяций, генотипировании, в маркировании признаков, а также в реализации целого ряда селекционных программ. RAPD технология является важным инструментом для быстрой идентификации маркеров, связанных с засухоустойчивостью, и весьма эффективна при определении генетического изменения среди генотипов пшеницы (Iqbal, 2007).

Однако, традиционные маркеры, такие как RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) - маркеры полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, AFLPs (amplified fragment length polymorphisms) - маркеры полиморфизма длины амплифицированных фрагментов и SSRs (simple sequence repeats) - простые повторы последовательности, а также RAPD, используемые для пшеницы, обычно разработаны не из самих генов, так как клонирование генов у пшеницы затруднено благодаря их аллогексаплоидной природе (2n = 6x = 42) и большому размеру генома (Wei, 2009). Наоборот, функциональные маркеры (FMs) обычно разрабатываются по полиморфизму в пределах транскрибированных областей функциональных генов. Такие маркеры полностью соответствуют функции гена (Andersen and Lübberstedt, 2003), независимо от сложной хромосомной структуры.

Воздействие стресса запускает некоторые начальные сенсоры, которые затем активируют сигнальные пути, приводящие к стресс-респонсивной генной экспрессии и физиологическим изменениям (Xiong et al., 2002). Именно регуляция экспрессии генов, вовлеченных в стрессотолерантность, является необходимой для усовершенствования этого признака у растений. В настоящее время серьезные усилия направлены на обнаружение и описание транскрипционных факторов (регуляторных белков), вовлеченных в стрессоспецифическую регуляцию генов (Amir-Hossain, 2010). Транскрипционные факторы являются мощными средствами для генной инженерии, так как их сверхэкспрессия может привести к апрегуляции всего ряда генов под их контролем. Факторы транскрипции – это белки с ДНК доменом, связывающим цис-действующие элементы, присутствующие в промоторе целевого гена. Факторы транскрипции можно сгруппировать в семейства, учитывая их ДНК-связывающий домен (Riechmann et al., 2000). Группа генов, контролируемая определенным типом факторов транскрипции, известна как регулон. У растений в ответ на абиотический стресс можно выявить, по крайней мере, четыре различных регулона: (1) регулон CBF/DREB; (2) регулон NAC (NAM, ATAF и CUC) и ZF-HD (гомеодомен - цинковый палец); (3) регулон AREB/ABF (белок, связывающий элемент ответа на АБК/АБК-связывающий фактор); и (4) регулон MYC (онкоген миелоцитоматоза)/MYB (онкоген миелобластоза).

Среди всех транскрипционных факторов (Gosal et al., 2009), внимание многих ученых привлекают факторы, связывающие элемент ответа на дегидратацию (DREB). DREB-белки являются представителями семейства ERF (факторы, связывающие элемент ответа на этилен) транскрипционных факторов. Особенностью всех DREB генов являются 3 консервативных области - EREBP/AP2 ДНК-связывающий домен, N-концевой сигнал ядерной локализации, и консервативная область богатая Ser/Thr, примыкающая к EREBP/AP2 домену (Agarwal, 2006). Они вовлечены в устойчивость к целому ряду стрессов, включая засуху, засоление, замораживание и т.д.

В данной работе засухоустойчивость различных генотипов пшеницы первоначально изучена RAPD маркерами. Далее приведен более глубокий скрининг для идентификация *Dreb 1* генов в различных геномах с помощью функциональных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили генотипы твердой (*Triticum durum* L.) и мягкой (*Triticum aestivum* L.) пшеницы, различающиеся по засухоустойчивости (Таблица 1).

Таблица 1. Генотипы пшеницы с разной степенью засухоустойчивости

№	Генотипы	Плоидность	Реакция на стресс
		Triticum durum L.	
1	Баракатли - 95		Устойчивый
2	Гарагылчыг - 2	Тетраплоидный	Чувствительный
3	Гырмызы бугда		Устойчивый
		Triticum aestivum L.	
4	Азаматли - 95		Устойчивый
5	Гийматли - 2/17		Средненустойчивый
6	Гырмызы гюль		Средненустойчивый
7	Тале - 38		Средненустойчивый
8	Рузи - 84	Гексаплоидный	Устойчивый
9	12 nd FAWWON No 97 (130/21)		Чувствительный
10	4 tn FEFWSN No 50 (130/32)		Средненустойчивый
11	Нурлу - 99		Средненустойчивый
12	Гобустан		Устойчивый

Выделение растительной ДНК. Выделение ДНК проводили по CTAB методу с некоторыми модификациями (Murray and Tompson, 1980). Свежую растительную ткань в виде фрагмента листа измельчали в присутствии жидкого азота и суспендировали в 1000 мкл экстракционном буфере CTAB (100 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 20 мМ ЭДТА; 1,4 мМ NaCl; 40 мМ β-меркаптоэтанол), предварительно согретого на водяной бане до 60°C. Гомогенизацию заканчивали интенсивным встряхиванием на Vortex. Затем в каждую пробирку добавляли 400 мкл хлороформа (99,8%) и пробирку аккуратно пе-

ремешивали. Далее пробирки помещали на водяную баню и инкубировали в течение 10 минут при 60^0C. После инкубации пробирки центрифугировали в настольной центрифуге типа Eppendorf (15000 g) 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования осторожно отбирали супернатант (следя за тем, чтобы не захватить частицы осадка) и переносили в чистые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл и добавляли 600 мкл холодного изопропанола, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 3-5 мин. На этой стадии можно наблюдать дисперсный осадок ДНК. Содержимое пробирок центрифугировали при комнатной температуре в настольной центрифуге типа Eppendorf (15000 g) в течение 10 мин. Осадок несколько раз промывали 70%-ным этанолом, подсушивали в термостате при 56°C в течение 5 минут и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Трис-HCl, pH 8; 1 мМ ЭДТА). Для полного растворения ДНК в буфере образцы на ночь оставляли в холодильнике при 4°C.

Определение количества ДНК. Количество ДНК было определено по оптической плотности при λ = 260 с помощью спектрофотометра ULTROSPEC 3300 PRO («AMERSHAM», США). Чистота геномной ДНК была определена по отношению поглощений A260/A280. Качество ДНК было проверено по работе образцов экстрагированных ДНК в 0,8% агарозном геле, окрашенном 10 мг/мл этидиум бромидом в 1×TBE (Tris base, Boric acid, EDTA) буфере.

Амплификация ДНК. Полимеразную цепную реакцию с RAPD маркерами проводили по методу Williams (1990). Амплификацию ДНК проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 10х буфера, 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 0,2 единиц Taq-полимеразы в инкубационном буфере. Для RAPD-анализа использовали 2 олигонуклеотидных декамерных праймера P6 и P7 («Eurogentec», США) (Таблица 2), ассоциированных с засухоустойчивостью (Pakniyat, 2007).

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность RAPD праймеров, использованных для амплификации ДНК

Обозначение праймера	Последовательность 5′→ 3′
P6	TCGGCGGTTC
P7	CTGCATCGTG

ПЦР проводили в амплификаторе «Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler» (Сингапур) в следующих условиях: 1цикл – 4 мин при 94°C; 10 цикл – 1 мин при 94°C, 1 мин при 36°C и 1мин при 72 ºC; 35 цикл – 1 мин при 94°C, 1 мин 36,2ºC, 1 мин 72ºC; заключительный цикл элонгации осуществляли при 72°C в течение 15 мин, затем держали при 4°C. Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1,2% агарозном геле в аппарате для проведения горизонтального электрофореза HR-2025-High Resolution («IBI SCIENTIFIC», США), с добавлением этидиумбромида и документировали с помощью «Gel Documentation System» («UVITEK», СК). Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно 100 bp ДНК маркера.

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагменов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме.

ПЦР с функциональными маркерами для *Dreb 1* гена проводили как описано (Wei, 2009) с некоторыми модификациями в амплификаторе Multigene Gradient («Labnet», США). Пять геном-специфичных праймеров для *Dreb 1* генов пшеницы разработанных с помощью Primer Premier 5.0 software («Eurogentec», США) (http://www.premierbiosoft.com) были использованы для амплификации ДНК (Таблица 3).

Таблица 3. Геном-специфические праймеры для Dreb 1 генов пшеницы

Праймеры	Последовательность (5′→3′)	Локализация в хромосоме	Ожидаемый размер (bp)	Ann. temp. (°C)
P18F	CCCAACCCAAGTGATAATAATCT	3B	717	50
P18R	TTGTGCTCCTCATGGGTACTT			
P20F	TCGTCCCTCTTCTCGCTCCAT	3D	1193	63
P20R	GCGGTTGCCCCATTAGACATAG			
P21F	CGGAACCACTCCCTCCATCTC	3A	1113	63
P21R	CGGTTGCCCCATTAGACGTAA			
P22F	CTGGCACCTCCATTGCCGCT	3D	596	63
P25F	CTGGCACCTCCATTGCTGCC	3A	596	57
PRa*	AGTACATGAACTCAACGCACAGGACAAC			

* а PR является общим праймером как для P22F, так и P25F, соответственно

ПЦР был проведен в суммарном объеме 20 мкл, содержащей 80 нг геномной ДНК, 1 х ПЦР буфера, 0,25 мкМ каждого праймера, 0,45 мМ каждого дезоксирибонуклеотида, 4,0 мМ MgCl2 и 1,6 единиц Taq-полимеразы («Sigma», США). Реакцию проводили в указанном выше амплификаторе следующим образом: начальная денатурация 1 цикл – 3 мин при 94°С; 34 цикла – 1 мин при 94°С, 1 мин при температуре отжига для каждого праймера, 1,5 мин при 72°С; и заключительный цикл элонгации проводили при 72°С в течение 10 минут, затем держали при 4°С. Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 2,5% агарозном геле для проведения горизонтального электрофореза HR-2025-High Resolution («IBI SCIENTIFIC» США), с добавлением этидиумбромида и документировали с помощью «Gel Documentation System» («UVITEK», СК). Размеры амплифицированных фрагменов определяли относительно 100 bp ДНК маркера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

RAPD-ПЦР анализ был проведен, используя проростки 12 генотипов *Triticum* L. с разной степенью засухоустойчивости. На рис. 1. показана электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных путем применения праймера P6 (5′TCGGCGGTTC3′). Этот праймер дает фрагменты 920 bp. У неустойчивого к засухе генотипа твердой пшеницы Гарагылчыг-2, и среднеустойчивых генотипов мягкой пшеницы Гийматли-2/17 и Гырмызы гюль этот фрагмент не выявляется. У всех остальных генотипов этот локус хорошо заметен на электрофореграмме, что является подтверждением устойчивости этих генотипов. Обращает на себя внимание тот факт, что 12nd FAWWON No 97 (130/21) оценивается, как неустойчивый к засухе генотип. Однако, у этого генотипа также выявляется локус в области 920 bp. Видимо, с генетической точки зрения, у него есть потенциал для устойчивости, но по некоторым причинам экспрессия этих генов не осуществляется.

Вторым RAPD праймером в наших экспериментах являлся маркер P7 (5′TCGGCGGTTC3′). Этот праймер продуцирует фрагмент в области 750 bp. Согласно электрофореграмме, ожидаемый фрагмент не выявляется как у устойчивого сорта Баракатли-95, так и у неустойчивых к засухе сортов Гарагылчыг-2 и Гийматли- 2/17 (Рис 2). Между тем, у чувствительного к засухе сорта Гырмызы гюль этот локус присутствует. Исходя из результатов ПЦР, проведенного с этим праймером, можно предположить, что RAPD маркер P7 не является абсолютно универсальным для засухоустойчивости и требует дополнительных исследований.

Далее был проведен более глубокий скрининг с целю идентификации *Dreb 1* генов, используя функциональные маркеры, специально синтезированные для A, B и D геномов пшеницы. Праймер P25F/PR синтезирован для амплификации 596 bp фрагментов ДНК *Dreb-A1* гена в геноме A. P21F/P21R также был выбран как праймер, амплифицирующий соответствующий регион (1113-bp ДНК фрагмент) этого же гена. Праймеры P22F/PR и P20F/P20R созданы для последовательностей *Dreb 1* гена из генома D, результатами амплификации, которых являются фрагменты ДНК с размером 596 и 1193 bp, соответственно. Праймер P18F/P18R, амплифицирующий 717-bp ДНК фрагмент, был синтезирован как специфический праймер для B генома.

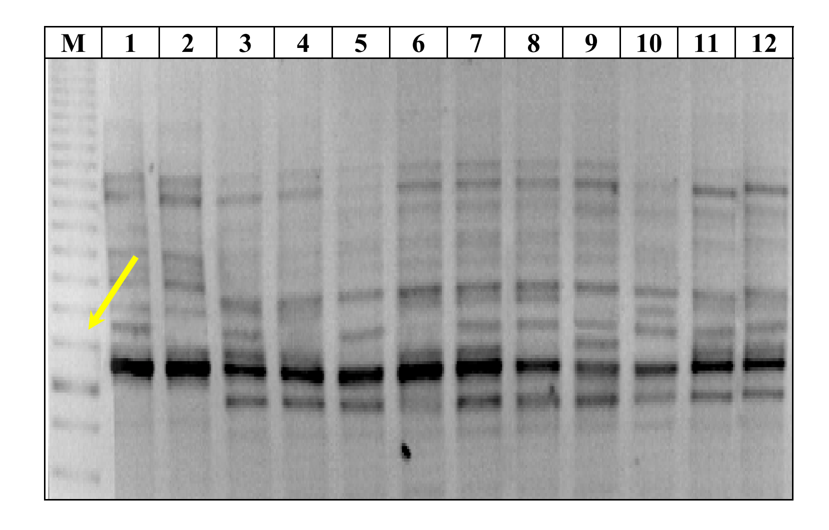


Рис. 1. RAPD-профили пшеницы (*Triticum* L.) растений, индуцированные праймером P6 (5′ TCGGCGGTTC 3′). Стрелка указывает зону 920 bp, которая присутствует у засухоустойчивых сортов и отсутствует у неустойчивых. M (маркер молекулярной массы) - 100 bp, 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Азаматли-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 - Гырмызы бугда, 6 - Гырмызы гюль, 7 – Тале-38, 8 - Рузи-84, 9 -12nd FAWWON No 97 (130/21), 10 - 4tn FEFWSN No 50 (130/32), 11 - Нурлу- 99, 12 - Гобустан.

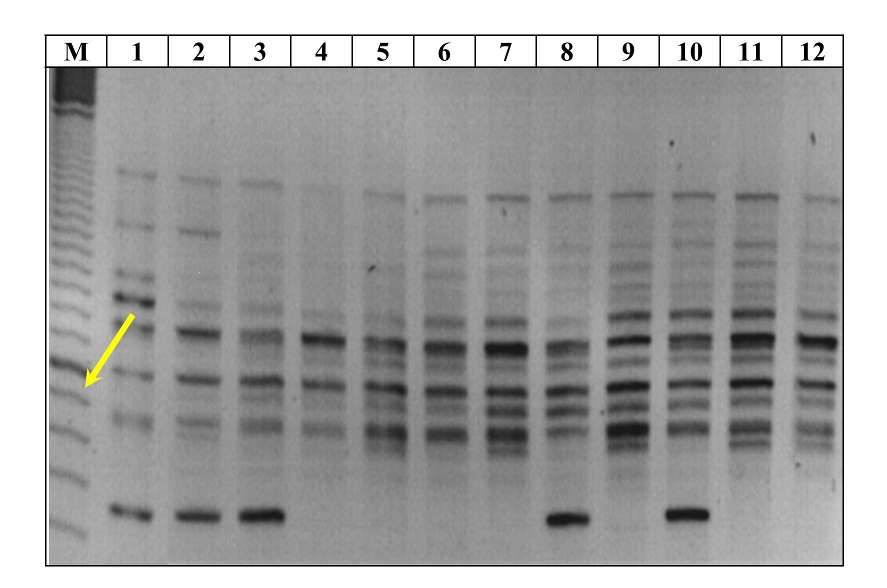


Рис. 2. RAPD-профили *Triticum* L. растений, индуцированные праймером P7 (5′ TCGGCGGTTC 3). Стрелка указывает зону 750 bp. M ДНК маркер - 100 bp, 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Азаматли-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 - Гырмызы бугда, 6 - Гырмызы гюль, 7 - Тале 38, 8 - Рузи-84, 9 - 12[nd] FAWWON No 97 (130/21), 10 - 4[tn] FEFWSN No 50 (130/32), 11 – Нурлу-99, 12 - Гобустан.

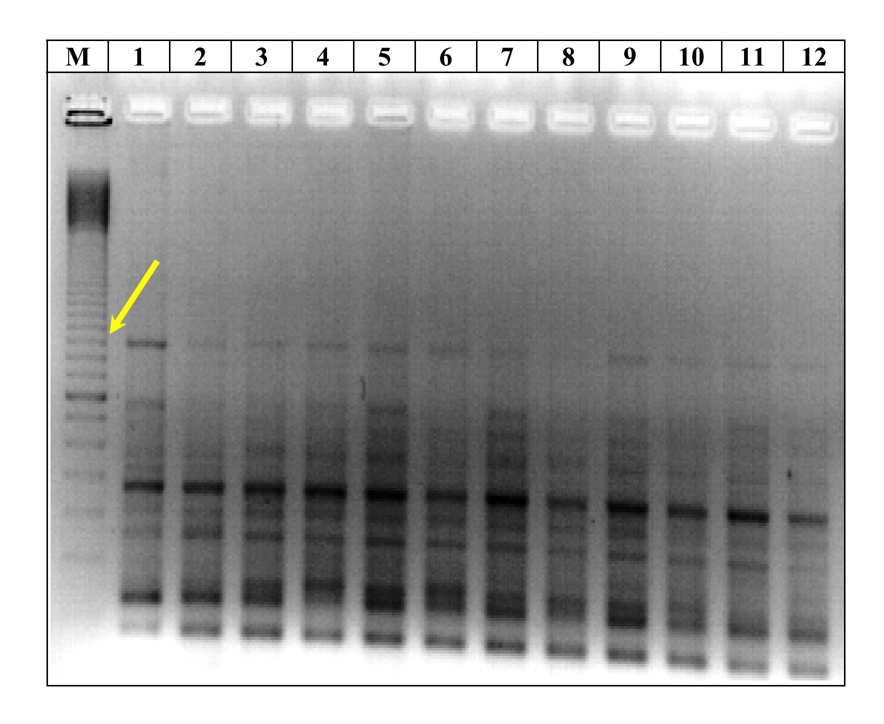


Рис. 3. ПЦР-профили генотипов пшеницы (*Triticum* L.) с применением праймера P21F/P21R, специфичного для генома A. Стрелка указывает фрагмент ДНК размером 1113 bp. M – ДНК маркер - 100 bp. 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Гырмызы бугда, 4 - Азаматли-95, 5 - Гийматли-2/17, 6 - Гобустан, 7 - Гырмызы гюл, 8 - Тале-38, 9 - Рузи-84, 10 - 12[nd] FAWWON No 97 (130/21), 11 - 4[tn] FEFWSN No 50 (130/32), 12 - Саратовская.

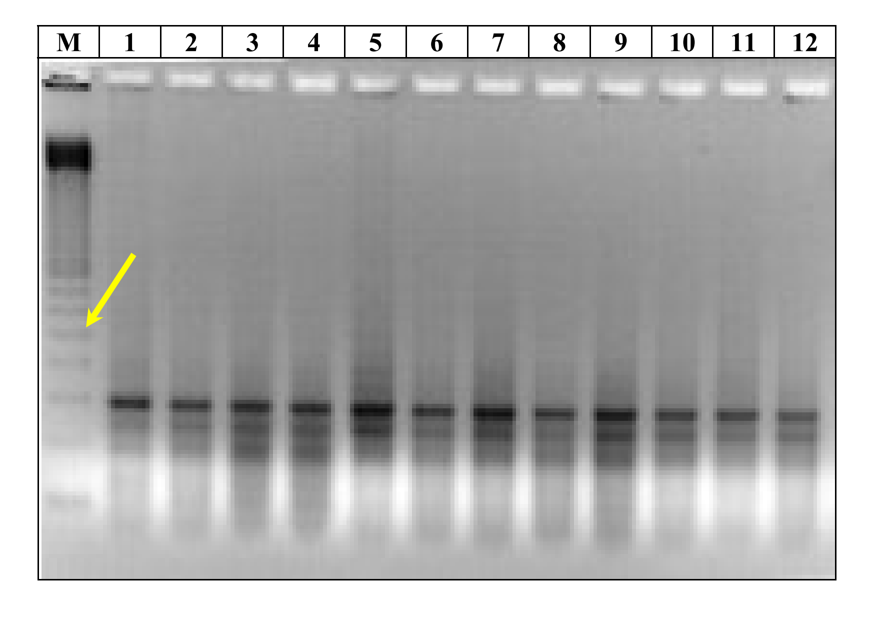


Рис. 4. ПЦР-профили генотипов пшеницы (*Triticum* L.) с применением праймера P25F/PR, специфичного для генома A. Стрелка указывает фрагмент ДНК размером 596 bp. M – ДНК маркер - 100 bp. 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Гырмызы бугда, 4 - Азаматли-95, 5 - Гийматли-2/17, 6 - Гобустан, 7 - Гырмызы гюль, 8 - Тале-38, 9 - Рузи-84, 10 - 12[nd] FAWWON No 97 (130/21), 11 - 4[tn] FEFWSN No 50 (130/32), 12 - Саратовская.

Гель-электрофорез ПЦР-профилей с применением праймера P21F/P21R, специфичного для генома A, показывает, что за исключением среднеустойчивого генотипа гексаплоидной пшеницы Тале-38, у всех остальных генотипов присутствует фрагмент в области 1113 bp, ответственный за *Dreb 1* ген в геноме A (Рис. 3). Это означает, что у этих генотипов на третьей хромосоме генома A присутствует ген *Dreb 1*, ответственный за толерантность как к засухе, а также и к другим факторам абиотического стресса (Agarwal, 2006).

Вторым праймером для *Dreb 1* гена в геноме A является P25F/PR, амплифицирующий фрагменты размером 596 bp. На рис 4. представлен гель-электрофорез ПЦР-профилей с применением этого праймера. Из рисунка видно, что фрагменты 596 bp не синтезировались у выбранных генотипов. Причиной отсутствия этих фрагментов могут быть мутации, возможно происходившие в регионе гена *Dreb 1*, комплементарном этому праймеру. Потому, что присутствие этого гена в геноме A у выбранных генотипов подтверждается результатами ПЦР с использованием праймера P21F/P21R.

Вей с сотр. выделили из генома A 1670 bp последовательность геномной ДНК гена *Dreb-A1*, кодирующего 261 аминокислот. Она включала более одного интрона, второй экзон и частично 30-UTR (Wei et al., 2009). В геноме A ими были обнаружены три аминокислотные мутации (аминокислоты 47, 151 и 184), включая распространенную мутацию, специфичную для пшеницы (аминокислота 184), расположенную в области богатой *Ser/Thr*, и бессмысленную мутацию у *T.durum* DS107 (аминокислота 47).

Результаты, полученные с применением праймера P18F/P18R, специфичного для *Dreb 1* гена в геноме B, представлены на рис 5. Как видно из рисунка пара фрагментов 717-789 bp выявляется только у Баракатли-95. Это указывает, на то, что у Баракатли-95 в геноме B также существует ген *Dreb 1*. Следует отметить, что тетраплоидный генотип Баракатли-95 проявляет высокую устойчивость по всем параметрам, по сравнению с другими генотипами. Отсутствие ожидаемых 717-789 bp фрагментов, указывающих на существование *Dreb 1* гена в геноме B у остальных генотипов можно объяснить высокой вариабельностью этого участка генома. Анализ сравнения аминокислотной последовательности DREB1 белков показал наиболее специфичные вариации в геноме B, включая три одиночные аминокислотные мутации (аминокислоты 46, 140 и 200) и делецию 24 аминокислот в области, богатой *Ser* и *Thr* у ортологичных A и D геномов, примыкающих к консервативной области, богатой *Ser/Thr*. 717 bp ПЦР продукт *Dreb B1* гена, выделенный из B генома, кодировал 176 аминокислот из экзона 1, и включал часть интрона и часть экзона 2 (Wei et al., 2009).

Мы проводили также ПЦР-анализ с праймерами P20F/P20R и P22F/PR, специфичными для генома D (Рис. 6 и 7). Как известно, геном D встречается только у гексаплоидных генотипов *Triticum aestivum* L. 1748 bp ДНК фрагмент, кодирующий 278 аминокислот, был изолирован из генома D (Wei et al., 2009). Этот фрагмент включает полностью ORF *Dreb-D1* гена, в том числе частично 50- и 30-UTRs. В наших экспериментах не были выявлены ожидаемые фрагменты размерами 596 и 1193 bp, ответственные за *Dreb1* ген в геноме D. Это дает нам возможность предполагать, что взятые нами сорта гексаплоидной пшеницы либо являются нуллисомиками, либо у них в геномах D отсутствуют пары хромосом, содержащие ген *Dreb 1*.

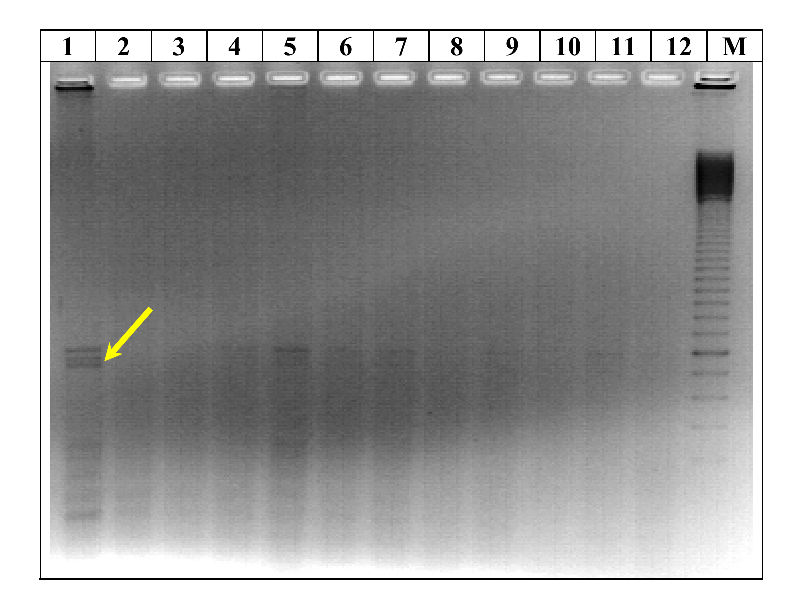


Рис 5. ПЦР-профили генотипов пшеницы (*Triticum* L.) с применением праймера P18F/P18R, специфичного для генома B. Стрелка указывает фрагмент ДНК размером 717-789 bp. M – ДНК маркер - 100 bp. 1 -Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Гырмызы бугда, 4 - Азаматли-95, 5 - Гиймятли-2/17, 6 - Гобустан, 7 - Гырмызы гюль, 8 - Тале-38, 9 - Рузи-84, 10 - 12nd FAWWON No 97 (130/21), 11 - 4tn FEFWSN No 50 (130/32), 12 - Саратовская.

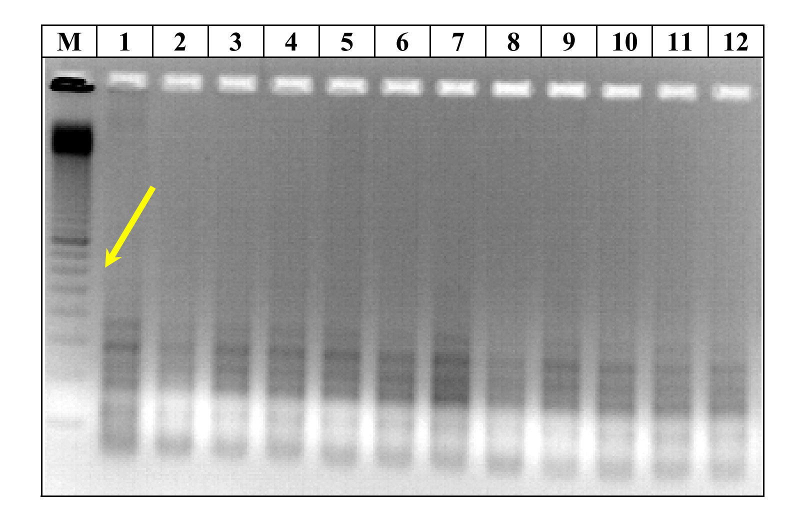


Рис. 6. ПЦР-профили генотипов пшеницы (*Triticum* L.) с применением специфичного для генома D праймера P20F/P20R. Стрелка указывает фрагмент ДНК размером 596 bp. M – ДНК маркер - 100 bp. 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Гырмызы бугда, 4 - Азаматли-95, 5 - Гийматли-2/17, 6 - Гобустан, 7 - Гырмызы гюль, 8 - Тале-38, 9 - Рузи-84, 10 - 12nd FAWWON No 97 (130/21), 11 - 4th FEFWSN No 50 (130/32), 12 - Саратовская.

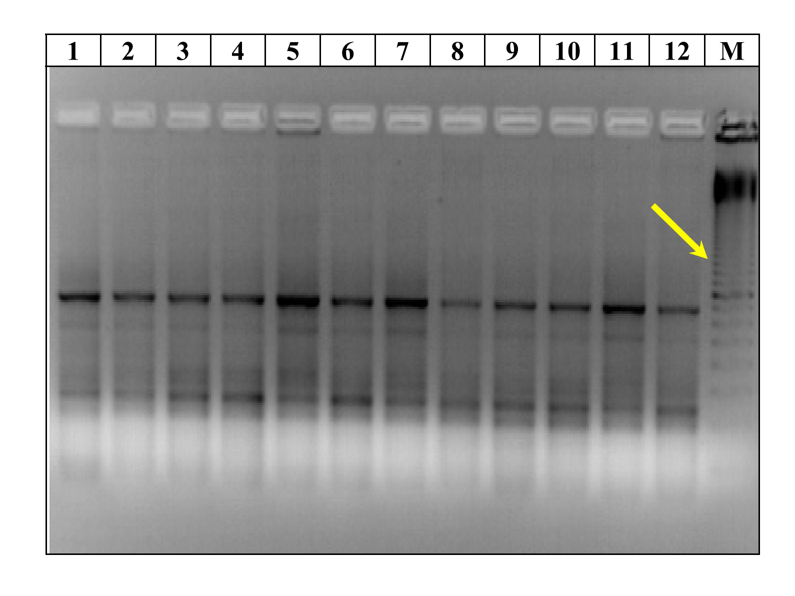


Рис. 7. ПЦР-профили генотипов пшеницы (*Triticum* L.) с применением праймера P22F/P22R, специфичного для генома D. Стрелка указывает фрагмент ДНК размером 1193 bp. M – ДНК маркер - 100 bp. 1 - Баракатли-95, 2 - Гарагылчыг-2, 3 - Гырмызы бугда, 4 - Азаматли-95, 5 - Гийматли-2/17, 6 - Гобустан, 7 - Гырмызы гюль, 8 - Тале-38, 9 - Рузи-84, 10 - 12nd FAWWON No 97 (130/21), 11 - 4th FEFWSN No 50 (130/32), 12 - Саратовская.

Таким образом, с помощью функциональных маркеров специфичных для *Dreb 1* генов пшеницы, мы выявили, что на третьей хромосоме генома А у 3 тетраплоидных и 8 гексаплоидных сортов пшеницы находится ген *Dreb 1*. В отличие от других генотипов, только у высокоустойчивого к засухе тетраплоидного генотипа Баракатли-95 этот ген выявляется как в геноме А, так и в геноме В.

DREB белки содержат ERF/AP2 ДНК-связывающий домен. Этот домен достаточно консервативен, и фактор(ы) транскрипции с его содержанием широко распространены во многих растениях, в том числе *Arabidopsis*, табаке (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995), рисе (Sasaki et al., 1994) и кукурузе (Moose and Sisco, 1996). Сравнение аминокислотных последовательностей различных белков DREB демонстрирует высокое сходство последовательности в сигнале ядерной локализации в N-терминальной области (NLS) и некоторое сходство в С-терминальном домене. В домене ERF/AP2 две аминокислоты, 14-валин и 19-глутаминовая кислота играют решающую роль в определении ДНК-связывающей специфичности. Консервативная серин/треонин-богатая область, которая находится рядом с ERF/AP2 доменом, считается ответственной за фосфорилирования DREB белков. Мотив DSAW в конце домена ERF/AP2 и LWSY мотив в конце С-терминала сохраняются в большинстве белков типа DREB1 (Agarwal, 2006).

Первыми выделенными кДНК, кодирующими DRE-связывающие белки, оказались CBF1, DREB1A и DREB2A (Liu et al., 1998) из *Arabidopsis*. С тех пор, DREB гены были выделены из большого числа растений. Два *DREB1A* гомолога (*DREB1B* и *DREB1C*) и один *DREB2A* гомолог (*DREB2B*) были выделены из *Arabidopsis*. Два гомолога *CBF1* (*CBF2* и *CBF3*) были выделены также из *Arabidopsis*. *CBF1* идентичен *DREB1B*, а его гомологи *CBF2* и *CBF3* идентичны *DREB1C* и *DREB1A*, соответственно. *CBF4* гомолог близкий к *CBF/DREB1* был описан у *Arabidopsis* (Haake et al., 2002).

Экспрессия генов *DREB1* широко исследована у различных сельскохозяйственных культур

применительно к различным абиотическим стрессам. Однако только ограниченное число видов растений изучалось на предмет экспрессии *DREB2*. Было обнаружено, что экспрессия гена *AtDREB1* индуцируется холодом, но не дегидратацией, или выраженным солевым стрессом. В ряде исследований было выявлено, что экспрессия обоих *DREB* генов индуцируется абиотическим стрессом, однако, в разные периоды времени. Фактор транскрипции типа *DREB2,* выделенный из пшеницы (*TaDREB1*) был резко индуцирован холодом, но слабо отвечал на засуху, соленость и АБК (Shen et al., 2003). На основе различных исследований становится ясно, что DREB белки являются важными факторами транскрипции в регуляции генов, связанных с абиотическим стрессом, и играют важнейшую роль в наделении растений выносливостью к стрессу. Накопление мРНК для факторов транскрипции, подобных *GLK1* и *GLK2*, участвующих в развитии фотосинтетического аппарата хлоропластов, стромального циклофилина хлоропластов *ROC4 (AtCYP20-3),* транслокатора β-амилазы и триозофосфат/неорганического фосфата позволяет предположить, что на развитие фотосинтетического аппарата хлоропластов и распад углеводов может оказывать влияние гиперэкспрессия *CBF*/*DREB1* у *Brassica* (Savitch et al., 2005). На экспрессию генов *DREB* также оказывают влияние другие члены того же семейства DREB. При использовании обратного генетического подхода было продемонстрировано, что *CBF2/DREB1C* функционирует как негативный регулятор экспрессии *CBF1/DREB1B* и *CBF3/DREB1A*.

Итак, функциональные маркеры (также называемые совершенными или диагностическими маркерами) могли бы быть идеальными орудиями селекции пшеницы, но в настоящее время их использование ограничено нехваткой генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для селекции генотипов устойчивых к различным неблагоприятным факторам внешней среды. Целенаправленное использование специфичных праймеров позволит исследователям сократить затраты труда и средств, необходимые для анализа коллекционных образцов. В будущем селекция, основанная на молекулярных маркерах, может значительно увеличить эффективность бридинга сельскохозяйственных культур (Manavalan, 2009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Agarwal M., Hao Y., Kapoor A., Dong C.H., Fujii H., Zheng X., Zhu J.K. (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. J. Biol. Chem. **281(49):** 37636-37645.

Amir Hossain M., Lee Y., Cho J.I., Ahn C.H., Lee S.K., Jeon J.S., Kang H., Lee C.H., An G., Park P.B. (2010) The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. Plant Mol. Biol. **72(4-5):** 557-566.

Andersen J.R., Lübberstedt T. (2003) Functional markers in plants. Trends Plant Sci. **8:** 554-560.

Ashraf M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. Biotechnol. Adv. **28:** 169.

Gosal S.S., Wani S.H., Kang M.S. (2009) Biotechnology and drought tolerance. J. Crop. Improvement **23:** 19-54.

Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F., Zhang J.Z. (2002) Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **130:** 639-648.

Harb A., Krishnan A., Ambavaram M.R., Pereira A. (2010) Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth Plant Physiol. **154(3):** 1254-1271.

Iqbal A., Khan A.S., Khan I.A., Awan F.S., Ahmad A., Khan A.A. (2007) Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA. Genet. Mol. Res. **6:** 476-481.

Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell **10:** 1391-1406.

Manavalan L.P., Guttikonda S.K., Phan Tran L.S., Nguyen H.T. (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. Plant Cell Physiol. **50(7):** 1260-1276.

Moose S.P., Sisco P.H. (1996) *Glossy15*, an *APETAL2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. Genes Dev. **10:** 3018-3027.

Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.

Nucleic Acids Res. **8:** 4321-4325.

Ohme-Takagi M, Shinshi H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell **7:** 173-182.

Pakniyat H., Tavakol E. (2007) RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Pakistan J. Biol.l Sci. **10:** 3237-3239.

Riechmann J.L., Heard J., Martin G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science **290:** 2105-2110.

Saibo N.J.M., Lourenço T., Oliveira M.M. (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Ann. Bot. **103:** 609-623.

Sasaki T., Song J., Koga-Ban Y., Matsui E., Fang F., Higo H., Nagasaki H., Hori M., Miya M., Murayama-Kayano E., Takiguchi T., Takasuga A., Niki T., Ishimaru K., Ikeda H., Yamamoto Y., Mukai Y., Ohta I., Miyadera N., Havukkala I., Minobe Y. (1994) Toward cataloguing all rice genes: large scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. Plant J. **6:** 615-624.

Savitch L.V., Allard G., Seki M., Robert L.S., Tinker N.A., Huner N.P.A., Shinozaki K., Singh J. (2005) The effect of overexpression of two *Brassica CBF*/*DREB1*-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. Plant Cell Physiol. **46:** 1525-1539.

Shen Y.G., Zhang W.K., He S.J., Zhang J.S., Liu Q., Chen S.Y. (2003) An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Theor. Appl. Genet. **106:** 923-930.

Wang W.S., Pan Y.J., Zhao X.Q., Dwivedi D., Zhu L.H., Ali J., Fu B.Y., Li Z.K. (2011) Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bot. **62(6):** 1951-1960.

Wei B., Jing R., Wang Ch., Chen J., Mao X., Chang X., Jia J. (2009) Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. Mol. Breeding **23:** 13-22.

Williams J.G., Kubelik K.J., Livak J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res. **18:** 6531-6535.

Xiong L., Lee H., Ishitani M., Zhu J.K. (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. J. Biol. Chem. **277:** 8588-8596.

İ.M. Hüseynova

Molekulyar Markerlərdən İstifadə Etməklə Buğda (*Triticum* L.) Genotiplərində Quraqlığa Davamlılığın Qiymətləndirilməsi

Molekulyar markerlərin köməyi ilə 12 buğda (*Triticum* L.) genotipinin quraqlığa davamlılığı yoxlanılmışdır. P6 markerindən istifadə etməklə aparılan PZR nəticəsində məlum olmuşdur ki, həssas genotiplərdən (Qaraqılçıq-2, Qiymətli-2/17 və orta davamlı Qırmızı gül) fərqli olaraq, davamlı genotiplərdə bu markerlə əlaqəli lokus 920 bp oblastında üzə çıxır. Göstərilmişdir ki, RAPD marker P7 buğda genotipləri üçün mütləq universal deyil. Quraqlığa davamlılığı cis-tənzimləyən Dreb1 transkripsiya faktorunun genləri üçün xüsusi sintez edilmiş funksional markerlərdən istifadə etməklə buğda genotiplərində quraqlığa davamlılığının daha dərin skriningi aparılmışdır. P21F/P21R markerindən istifadə zamanı Tale-38 genotipindən başqa, qalan bütün genotiplərdə 1113 bp sahəsində fraqmentlər amplifikasiya olunmuşdur ki, bu da həmin genotiplərin A genomlarının üçüncü xromosomlarında Dreb A1 geninin olmasını göstərir. Digər genotiplərdən fərqli olaraq, davamlı Bərəkətli-95 genotipində B genomunda yerləşən Dreb B1 geninin 717 bp sahəsində PZR məhsulu müşahidə edilir. *Triticum aestivum* L. genotipləri üçün xarakterik olan D genomundan 596 və 1193 bp fraqmentləri amplifikasiya edən P22F/PR və P20/F/P20R praymerləri müsbət nəticə verməmişdir.

I.M. Huseynova

Use of Molecular Markers for Evaluation Drought Stress Tolerance in Wheat (*Triticum* L.) Genotypes

Several screening tests were carried out to evaluate drought resistance in total 12 wheat (*Triticum* L.) genotypes. As a result of PCR using RAPD markers it was found out that primer P6 produced 920 bp band in drought tolerant genotypes in comparison to sensitive ones (Garagylchyg-2, Giymatli-2/17 and semi-tolerant Gyrmyzy gul). Primer P7 produced a 750-bp band that is not absolutely universal for our genotypes. Genome-wide investigation was also conducted using *Dreb 1* genes as an example. P21F/P21R primer amplified 1113 bp fragment in all tested genotypes, excluding Tale-38, suggesting that in these genotypes *Dreb 1A* gene is located on the third chromosome of A genome. The P18F/P18R primer amplified a 717 bp fragment from the B genome. It was found out that *Dreb 1* gene was located on chromosome 3A in all genotypes, including drought-tolerant and drought-sensitive ones, excepting semi-tolerant genotype Tale-38. Contrary to other genotypes, a 717 bp PCR product of *Dreb 1B* gene was located on B genome from drought-tolerant variety Barakatli-95. Primers P22F/PR and P20F/P20R that amplify 596 and 1193 bp fragments, respectively, from D genome, that is common for hexaploid *Triticum aestivum* L. genotypes, did not reveal positive results.